

高速逆流色谱-高效液相色谱法制备甘薯茎叶中化合物

陆英^{1,2}, 廖红梅², 谭君^{1,2}, 吴朝比², 刘仲华^{1*}

(1.国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128; 2.湖南农业大学 园艺园林学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 以徐薯 18 型甘薯茎叶为原料, 建立了高速逆流色谱法制备分离甘薯茎叶中化合物的方法. 以正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(0.5% 乙酸)(体积比 0.5:5:1:5)为溶剂系统, 上相为固定相, 下相为流动相, 流速 2 mL/min, 转速 900 r/min, 进行 2 次分离, 并结合 1 次制备高效液相, 共分离得到 7 个高纯度化合物. 结合化学显色反应、紫外扫描、高效液相色谱等, 初步鉴定 4 个为黄酮类化合物, 其中 1 个为芦丁, 1 个为槲皮苷.

关键词: 甘薯茎叶; 高速逆流色谱; 高效液相色谱; 制备

中图分类号: O657.7 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)05-0581-04

Isolation and preparation compounds from sweet potato stalk and leaf by HSCCC-HPLC

LU Ying^{1,2}, LIAO Hong-mei², TAN-Jun^{1,2}, WU Chao-bi², LIU Zhong-hua^{1*}

(1.National Research Center of Engineering Technology For Utilization of Functional Ingredients From Botanicals, Changsha 410128,China; 2.College of Horticulture and Landscape, HNAU, Changsha 410128, China)

Abstract: Leaves of Xushu-18 was used as raw material to have established a method for isolation and preparation of chemical compositions from sweet potato stalk by high speed counter-current chromatography-high performance liquid chromatography (HSCCC-HPLC). N-hexane-ethyl acetate-methanol-water(0.5% acetic acid) (0.5 : 5 : 1 : 5, V/V) was used as the two-phase solvent system. The upper one was used as the stationary phase, while the lower phase was used as the mobile one. Separation was performed twice at a flow-rate of 2 mL/min and a revolution speed of 900 r/min. Seven compounds were got and HSCCC was separated in the same solvent system and preparation high performance liquid chromatography. The structures were identified primarily by colour reaction, UV spectrometry and HPLC. The results showed one of them was rutin and the other was quercitrin.

Key words: sweet potato stalk and leaf; high speed counter-current chromatography; high performance liquid chromatography; isolation and preparation

甘薯叶除具有较高的营养价值外, 还具有抗菌、抗肿瘤、提高免疫力、降血脂、降胆固醇、抗氧化等生理作用, 其主要活性成分之一为黄酮类化合物^[1]. 目前对甘薯叶中化学成分^[2-4]的分离多采用

硅胶色谱、凝胶色谱等方法, 存在操作繁琐、重现性差、制备量小等缺点. 高速逆流色谱法(HSCCC)^[5-9]是近年来发展起来的一种新型的天然化合物分离制备方法, 它采用液体溶剂作为固定相

收稿日期: 2009-06-18

基金项目: 湖南省科学技术厅项目(2009NK3106); 湖南省教育厅项目(10C0799)

作者简介: 陆英(1970—), 女, 湖南古丈人, 硕士, 讲师, 从事植物功能成分的分离纯化工程研究; *通讯作者, larkin-liu@163.com

和流动相,通过溶剂的选择可分离多种天然化合物,同时具有操作简单、制备量大、重现性好、可获得多种高纯度化合物等优点.笔者尝试建立甘薯茎叶中化学成分的高速逆流色谱制备方法,并获得7个高纯度化合物,现将结果报道如下.

1 材料与方法

1.1 材料

徐薯18型甘薯茎叶,2008年7月中旬购于湖南长沙某市场.芦丁、槲皮素、槲皮苷标准品,购于中国药品生物制品检定所.正己烷、石油醚、甲醇、乙酸乙酯、冰醋酸等均为分析纯(天津市博迪化工有限公司),色谱甲醇(天津市大茂化学试剂厂),色谱乙腈(国药集团化学试剂有限公司).

1.2 主要仪器

TBE-300A型高速逆流色谱仪(上海同田生化技术有限公司),配有TBD-2000外检测仪、LX-300恒温器、TBP-50A恒流泵(北京长流科技仪器公司);LC10 AT-VP Plus高效液相色谱系统(日本岛津公司), C_{18} 反相色谱柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);Lab Tech可见-紫外分光光度计(北京莱伯泰科仪器有限公司);LC-8A制备型高效液相色谱仪(日本岛津公司),Shin-pack PRC-DOC色谱柱.

1.3 方法

1.3.1 甘薯茎叶粗提物的制备

将新鲜的甘薯茎叶于室内晾干,置烘箱60 $^{\circ}$ C干燥,粉碎,取100 g加1 000 mL 60%乙醇,70 $^{\circ}$ C回流提取2次,每次1.0 h,滤液减压浓缩,加入蒸馏水至200 mL,过滤,滤液用等量乙酸乙酯萃取3次,滤渣用乙酸乙酯洗涤,合并乙酸乙酯层,减压浓缩后水浴蒸干,得乙酸乙酯粗提物5.8 g.

1.3.2 分析型HPLC方法的建立

采用 C_{18} 色谱柱,分别用甲醇-水、甲醇-水(0.5%冰醋酸)、乙腈-水(0.5%冰醋酸)为HPLC流动相,采用梯度洗脱模式对甘薯茎叶粗提物甲醇溶液进行分析,建立HPLC分析方法.

1.3.3 HSCCC溶剂体系的选择

通过测定分配系数 K 值来选择HSCCC的溶剂体系.将不同溶剂按比例配制,充分混匀,静置平衡后取适量粗提物用下相溶解,过0.45 μ m膜,取10 μ L溶液经HPLC检测,各峰面积记录为 A_1 ;再取该下相2 mL加入等体积的上相充分混合,取下相10 μ L经HPLC检测,各峰面积记录为 A_2 ,按公式计算 K 值: $K=(A_1 - A_2)/A_2$.选择 K 值适合的溶剂体系作为HSCCC的溶剂体系.

1.3.4 HSCCC的制备分离及分离条件的优化

称取粗提物200 mg,用10 mL下相溶解,从进样口加入.检测波长254 nm,温度28 $^{\circ}$ C,进样1 h后进行图谱采集.根据峰形分别收集流出液,减压浓缩干燥,并取少量样品供HPLC分析.分别考察转速、流速、进样量对分离效果的影响.

将流分II、IV合并,浓缩后在相同的条件下进行第2次分离,流出液根据峰形接收并检测,减压浓缩干燥.

1.3.5 制备型HPLC分离

将流分I浓缩后至干,用少量甲醇溶解,过0.45 μ m膜,采用制备型高效液相色谱进行分离,10%乙腈等梯度洗脱,流速15 mL/min,检测波长254 nm.根据峰形分别收集流出液,流出液减压浓缩干燥.

1.3.6 单体化合物的初步定性

取适量分离得到的单体化合物,用甲醇溶解,在200~400 nm扫描得紫外吸收图谱,再取适量样品进行黄酮类化合物显色反应(Mg-HCl、NaOH、 $AlCl_3$ 反应),对显色结果为阳性的化合物与芦丁、槲皮素、槲皮苷标准品进行HPLC分析,以保留时间和样品加标方法定性.

2 结果与讨论

2.1 HPLC检测条件的确定

通过对不同流动相组成及洗脱梯度的摸索,发现在以下条件下粗提物中各组分分离较好:A泵,水(0.5%冰醋酸);B泵,甲醇梯度洗脱:0 min 32% \rightarrow 30 min 60%,波长254 nm,流速1 mL/min,柱温35 $^{\circ}$ C,进样量10 μ L,结果见图1,由图1可见,其中至少含有7种组分.

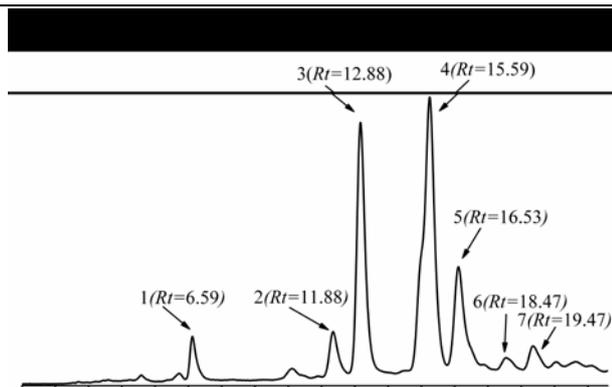


图 1 甘薯茎叶乙酸乙酯粗提物 HPLC 图谱

Fig.1 HPLC chromatogram of ethyl acetate extractive form pomoea batatas lam leaves

2.2 HSCCC 溶剂体系

HSCCC 不同溶剂体系的 K 值如表 1 所示。由于粗提物中组分较多，其中一些组分的 K 值较为接近，因此要一次分离得到多种高纯度组分比较困难，考虑进行二次分离。

表 1 不同溶剂体系各峰 K 值Table 1 K -values of the compounds in different two-phase solvent systems

溶剂系统(V/V)	K 值						
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7
①: EA-M-W(5:1:3)	3.33	0.57	1.55	1.49	0.92	2.32	2.12
②: EA-M-W(7:1:5)	2.79	0.46	1.99	1.78	1.14	3.49	2.33
③: H-EA-M-W(0.25:5:0.25:5)	2.82	0.49	2.03	1.10	1.44	2.38	2.06
④: H-EA-M-W(0.5:5:2:5)	2.91	0.17	0.65	0.98	0.23	1.84	1.94
⑤: H-EA-M-W(0.25:5:1:5)	5.02	0.08	1.38	0.95	0.61	2.38	1.59
⑥: H-EA-M-W(0.5:5:1:5)	4.02	0.43	1.17	0.79	0.67	2.08	1.22

H 正己烷; EA 乙酸乙酯; M 甲醇; W 水。

对上述溶剂体系进行 HSCCC 分离，结果表明，系统⑥的分离效果最好，但峰 1 保留时间太长。由于在色谱中加入少量的酸可以改善峰的分度，因此用 0.5% 的乙酸水溶液替代水进行溶剂体系的配制，结果发现峰 1 的保留时间大为缩短，确定正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(0.5% 乙酸)=0.5:5:1:5 作为 HSCCC 分离的溶剂体系。

2.3 HSCCC 分离条件的优化及分离结果

结果表明，转速分别为 800、850、900 r/min 时，转速越高固定相的保留率越高，分离效果越好；当流动相流速分别为 1、1.5、2.0、2.5 mL/min 时，流速较低，则分离时间过长，峰形扩展，流速较大时，分离效果差，以流速 2 mL/min 最为合适；当

进样量大于 200 mg 时，分离度降低。最终选择 HSCCC 的分离条件为：转速 900 r/min、流速 2 mL/min、进样量 200 mg。在该条件下固定相保留率为 53%，HSCCC 图谱见图 2。经 HSCCC 第 1 次分离后共有 5 个流分，经 HPLC 检测发现：流分 I 为图 1 中的 4 号峰，流分 II 为 6、7 号峰，流分 III 为 2 号峰、流分 IV 为 1、5 号峰，流分 V 为 3 号峰。流分 II、IV 经 HSCCC 第 2 次分离，得到 1、5、7 号峰，6 号峰由于量少未能得到。

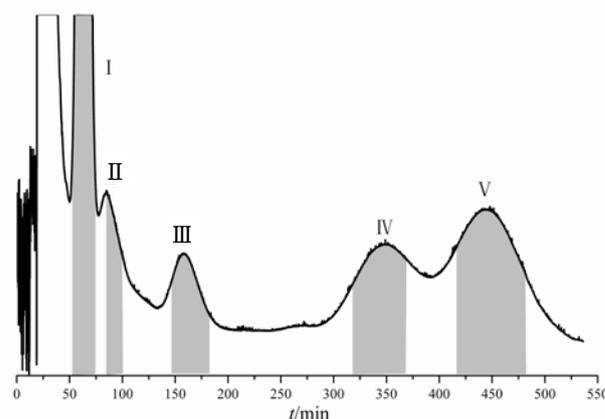


图 2 甘薯茎叶乙酸乙酯粗提物 HSCCC 图谱

Fig.2 HSCCC chromatogram of ethyl acetate extractive form sweet potato stalk and leaf

2.4 制备型 HPLC 分离流分 I

流分 I 经 HPLC 检测发现峰形不对称，疑为 2 个未分离的化合物，用制备型 HPLC 分离，10% 乙腈等度洗脱，在 90 min 内分离得到流分 4-I、4-II，见图 3，推测 2 物质在结构上有较大的相似性。

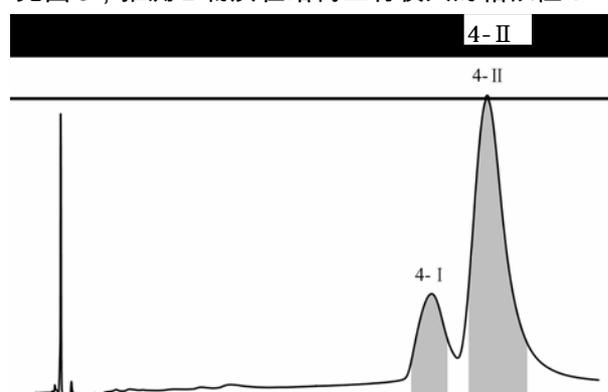


图 3 流分 I 的制备 HPLC 图谱

Fig.3 Preparative HPLC spectrum of fraction I

经上述分离，共得到 7 个化合物，见图 4，面积归一法计算其纯度为：化合物 1，99.7% (1 号峰，

2 mg); 化合物 2, 96.7%(2 号峰, 2 mg); 化合物 3, 2 mg); 化合物 4-II; 99.6%(峰 4-II, 4 mg); 化合物 96.6%(3 号峰, 6 mg); 化合物 4-I, 98.9%(峰 4-I, 5 : 90%(峰 5, 2 mg)、化合物 7, 93.7%(峰 7, 1 mg) .

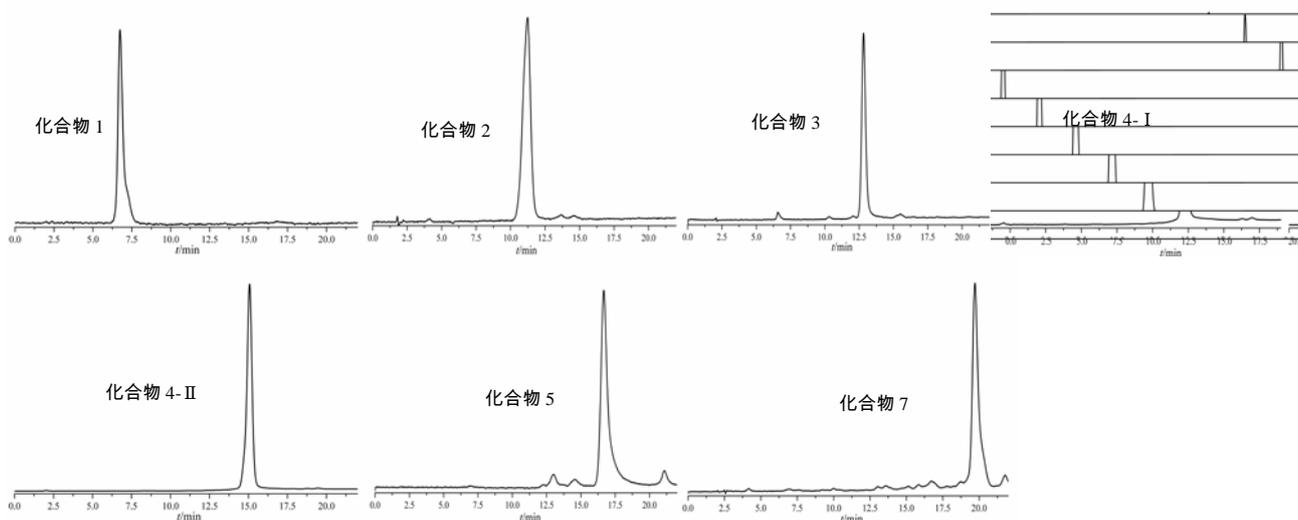


图 4 7 种化合物的 HPLC 图谱

Fig.4 HPLC of seven compounds

2.5 化合物类型的初步鉴定

显色反应结果表明, 化合物 4、5、7 在 Mg-HCl 反应中呈阳性, 且紫外光谱具有黄酮类化合物特有的吸收带 I (300~400 nm) 和带 II (240~280 nm), 推测为黄酮类化合物; 化合物 3 与 NaOH、AlCl₃ 溶液反应呈阳性, 但在 Mg-HCl 反应中呈阴性, 紫外光谱带 II 在 245~270 nm, 且带 I 以肩峰出现, 推测其可能为异黄酮类化合物; 化合物 1、2、6 的类型需进一步研究.

将化合物 4、5、7 与标准品进行 HPLC 对照分析, 结果化合物 4-I 与芦丁的保留时间一致, 且二者混合溶液的 HPLC 峰为一对称单峰, 推测该化合物为芦丁; 化合物 7 与槲皮苷的保留时间一致, 且二者混合溶液的 HPLC 峰为一对称单峰, 推测该化合物为槲皮苷.

参考文献:

- [1] 张彧, 吴祎南, 陈莉, 等. 红薯茎叶化学组成的研究进展[J]. 食品科学, 2006, 27(3): 252-255.
- [2] 陆英, 吴朝比, 蒋华军, 等. 红薯茎叶黄酮分离纯化工艺及抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(14): 114-118.

- [3] 向仁德, 丁健辛, 韩英, 等. 引种的巴西甘薯叶化学成分研究[J]. 中草药, 1994, 25(4): 179-181.
- [4] 罗建光, 孔令义. 巴西甘薯叶黄酮类成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(7): 516-517.
- [5] Wei Y Zhang, T Xu G, Ito Y. Application of analytical and preparative high-speed counter-current chromatography for separation of lycopene from crude extract of tomato paste[J]. J Chromatography A, 2001, 929: 169-173.
- [6] 张天佑. 逆流色谱技术[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 1991: 1.
- [7] Cao X L, Tian Y, Zhang T Y. Separation and purification of isoflavones from *Pueraria lobata* by high speed counter-current chromatography[J]. J Chromatography A, 1999, 855: 709-713.
- [8] Du Q, Lab H, Ito Y, et al. Preparative separation of isoflavone components in soybeans using high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatography A, 2001, 923: 271-274.
- [9] 颜继忠, 褚建军, 徐聪, 等. 高速逆流色谱分离金果榄中巴马亭[J]. 理化检验: 化学分册, 2004, 40(8): 450-451.

责任编辑: 罗慧敏
英文编辑: 胡东平